

Arbeit aus dem Institut für Angewandte Genetik
der Freien Universität Berlin

DIE HÄUFIGKEIT VON SCHWESTERCHROMATIDENAUSTAUSCH
UND CHROMOSOMENABERRATIONEN IN OLIGOCHIASMATISCHEN
MUTANTEN UND DER STANDARDFORM VON VICIA FABA L.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

VORGELEGT DEM FACHBEREICH BIOLOGIE

DER

FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

von

Dipl.-Biol. Richard Vogel

aus Siegen (Westf.)

1983



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546614_0011

Arbeit aus dem Institut für Angewandte Genetik
der Freien Universität Berlin

DIE HÄUFIGKEIT VON SCHWESTERCHROMATIDENAUSTAUSCH
UND CHROMOSOMENABERRATIONEN IN OLIGOCHIASMATISCHEN
MUTANTEN UND DER STANDARDFORM VON VICIA FABA L.

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
VORGELEGT DEM FACHBEREICH BIOLOGIE
DER
FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

von
Dipl.-Biol. Richard Vogel
aus Siegen (Westf.)

1983

1. Referent: Prof. Dr. G. LINNERT
2. Referent: Prof. Dr. K. SPERLING

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.1983

INHALT

	Seite
1. Einleitung	5
2. Material und Methode	7
2.1. Material	7
2.2. Methoden	7
2.2.1. Ankeimen der Samen	7
2.2.2. Behandlungen	8
2.2.2.1. Vorbehandlungen zur differentiellen Anfärbung der Schwesterchromatiden	8
2.2.2.2. Mutagenbehandlungen	9
2.2.2.3. Coffeinzugabe	11
2.2.3. Präparation und Auswertung	11
2.2.3.1. Schwesterchromatid-Austausche	11
2.2.3.2. Chromosomen-Aberrationen	12
3. Ergebnisse	13
3.1. Der Schwesterchromatiden-Austausch	13
3.1.1. Häufigkeit des SCE	13
3.2. Die Aberrationen	20
3.2.1. Art der Aberrationen	20
3.2.2. Häufigkeit der Aberrationen	26
3.2.2.1. Mutagenbehandlung	26
3.2.2.2. Vorbehandlung mit Coffein	30
3.2.2.3. Nachbehandlung mit Coffein	30
4. Diskussion	32
4.1. Formaler Ablauf der drei Phänomene Crossing-over, Schwesterchromatiden-Austausch und Exchange-Aberration	32

	Seite
4.1.1. Crossing-over	32
4.1.2. Schwesterchromatiden-Austausch	33
4.1.3. Exchange-Aberrationen	34
4.2. Die allgemeine Wirkung der Agentien	35
4.2.1. Die Wirkung des UV-Lichts	35
4.2.2. Die Wirkung des Quinacrine Mustard	37
4.2.3. Die Wirkung des Coffein	39
4.2.4. Zusammenfassung	40
4.3. Die spezielle Wirkungsweise der Agentien	41
4.3.1. Die spezielle Wirkungsweise von UV-Licht und Quinacrine Mustard	41
4.3.2. Die spezielle Wirkungsweise von Coffein	42
4.3.2.1. Die Coffein-Nachbehandlung	42
4.3.2.2. Die Coffein-Vorbehandlung	43
4.3.3. Zusammenfassung	44
4.4. Die Häufigkeit der meiotischen Rekombinations- ereignisse im Vergleich zu den Frequenzen von Exchange-Aberrationen und SCE	45
5. Zusammenschau	49
6. Literaturverzeichnis	51

1. EINLEITUNG

Rekombinationsvorgänge zwischen zwei DNS-Doppelhelices finden sich bei Eukaryonten als natürlicher Prozeß regelmäßig in Form von Crossing-over in der Meiosis, aber auch in Mitosekernen als Schwesterchromatidenaustausch. Nach Anwendung von Mutagenen kann ein drittes Rekombinationsereignis beobachtet werden: die Chromosomen-Aberration vom Exchange-Typ.

Schwesterchromatid-Austausch (SCE) ist offenbar ein reziproker Austausch von identischen DNS-Duplicates und hat damit keine Folgen für die genetische Konstitution. Nachdem nun einfache Methoden zur Analyse zur Verfügung stehen, sind viele Forscher bemüht, das Phänomen des SCE zu erklären. Dabei ist es naheliegend, vergleichende Untersuchungen zu solchen Ereignissen anzustellen, die ebenso wie das SCE auf Bruch und Reunion von DNS-Duplicates beruhen.

In einer Reihe von Arbeiten wurde geprüft, ob Mutagene die Häufigkeiten von SCE und Chromosomen-Aberrationen in vergleichbarer Weise erhöhen. In der Regel ist dies der Fall (BEEK and OBE, 1975). Einige wenige Mutagene erwiesen sich aber, wie zum Beispiel das Coffein, als nicht SCE-induzierend (KIHLMAN and STURELID, 1978). Coffein löst jedoch nicht unmittelbar Aberrationen aus, sondern verstärkt die Wirkung direkter Mutagene, indem es auf eine spätere Phase der Aberrationsentwicklung Einfluß nimmt.

Unter Verwendung von sowohl Coffein als auch von UV-Strahlen und dem Chemomutagen Quinacrine Mustard, welche beide in der Lage sind, DNS-Schäden auszulösen, soll in der vorliegenden Arbeit dem Zusammenhang zwischen SCE und Chromosomen-Aberrationen unter einem weiteren Aspekt nachgegangen werden:

nämlich dem Einfluß des Genotyps zweier Mutanten von *Vicia faba*, die abgestuft reduzierte Chiasmafrequenzen aufweisen. Damit soll eine mögliche Wirkung des verminderten Rekombinationsgeschehens während der Meiosis auf die beiden anderen Bruch-und Reunionsereignisse untersucht werden, um zu einem besseren Verständnis vom Rekombinationsgeschehen zu gelangen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

JAN SJÖDIN (1970) selektierte aus der Standardform von *Vicia faba*, Sorte "Primus" nach Behandlung mit Äthylmethansulfonat (ÄMS) im Jahre 1961 die Mutante A 16 und nach einer Neutronenbestrahlung 1966 die Mutante A 8. A 8 wies eine Chiasmafrequenz von 3,81, A 16 von 9,48 auf gegenüber Standard mit 17,6 Chiasmata pro Zelle. SJÖDIN bezeichnete die Mutanten daher als partiell asynaptisch bezogen auf die Metaphase I der Meiosis.

Analysen der meiotischen Prophase durch LINNERT, FRIEBE und VOGEL (1981) deuten darauf hin, daß die Reduktion der Chiasmafrequenzen bei A 8 und A 16 durch teilweisen Paarungsausfall zwischen homologen Chromosomen während des Pachytän, d.h. durch partielle Asynapsis im engeren Sinn verursacht ist. Eindeutig konnte dies aber mit Hilfe der Lichtmikroskopie nicht geklärt werden, so daß die Mutanten besser neutral als oligochiasmatisch angesprochen werden sollten.

Die Chromosomen von A 8 und A 16 weichen morphologisch nicht von denen der Standardform ab: Das Komplement besteht aus einem Paar metazentrischer (M-) Chromosomen, welche auf einem Schenkel (M_n) die Nukleolus - Organisator - Region (NOR) tragen und aus zehn durch ihre äussere Gestalt nicht weiter unterscheidbaren subtelozentrischen (S-) Chromosomen.

2.2. Methoden

2.2.1. Ankeimen der Samen

Nach 24 - stündigem Quellen in einem kleinen Becherglas mit Leitungswasser wurden die Samen auf ein engmaschiges Gitterrost gesetzt, welches über eine tiefe Petrischale gelegt wurde. Die Petrischale nahm die verschiedenen Behandlungslösungen auf.

Nach 6 - 7 Tagen mit Erreichen einer Länge von ca. 60 mm wurden die Spitzen der Hauptwurzeln abgeschnitten, um das Wachstum von Seitenwurzeln zu stimulieren. Diese waren drei Tage später mit 20 - 30 mm genügend lang um die unten beschriebenen Behandlungen zu beginnen.

Pro Ansatz wurden 7 - 8 Samen aufgewendet, die bei einer Temperatur von konstant 25 °C im Dunkeln angekeimt und behandelt wurden. Währenddessen sind die jeweiligen Lösungen mittels einer Aquarium - Luftpumpe ständig gut durchlüftet worden.

2.2.2. Behandlungen

2.2.2.1. Vorbehandlung zur differentiellen Anfärbung der Schwesterchromatiden

Die Seitenwurzeln wurden einen Zellzyklus lang, 12 Stunden im Normalfall einer Lösung mit 5-Bromdesoxyuridin (BrdU), Fluordesoxyuridin (FdU) und Uridin (Urd) ausgesetzt. BrdU (Sigma Art.B-5002) wurde in einer Konzentration von 10^{-4} M FdU (Sigma Art.F-0503) von 10^{-7} M und Urd (Sigma Art.U-3750) von 5×10^{-6} M appliziert. Nach dem ersten Zellzyklus sind die Schwesterchromatiden in jeweils einem DNS-Einzelstrang BrdU - substituiert. Gemäß der Terminologie von KORENBERG und FREEDLAENDER (1974) werden die Chromatiden als TB/TB bezeichnet, wobei T für Thymidin und B für 5-Bromdesoxyuridin steht. Nach einer weiteren Replikations-

runde in Anwesenheit von Thymidin (Sigma Art.T-9250) und Uridin liegen die Schwesterchromatiden in TT/TB - Konfiguration vor.

Nach Ablauf des zweiten Zellzyklus wurden die Wurzelspitzen colchiziniert, dann abgeschnitten und in kaltem Äthanol - Eisessig Gemisch (Verhältnis 3 : 1) über Nacht fixiert.

2.2.2.2. Mutagenbehandlung

Zwischen den beiden im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Behandlungszyklen wurden die Wurzeln eine Stunde lang entweder mit UV - Licht bestrahlt oder mit Quinacrine Mustard behandelt. Alle Behandlungen fanden stets im Dunkeln statt, so daß eine Photoreaktivierung entstandener Dimere ausgeschlossen werden kann, und es andererseits auch zu keiner Photolyse von BrdU durch sichtbares Licht kommen konnte.

Die UV - Bestrahlung erfolgte mit zwei Schwarzlichtröhren vom Typ Osram L 40 W/73, Wellenlänge 350 nm, was einer Energie von 3,6 eV entspricht. Der Abstand zwischen Lampe und Wurzeln betrug 20 mm. Durch eine Unterlage aus feuchtem Filterpapier mußten die Wurzeln vor dem Austrocknen geschützt werden.

Quinacrine Mustard (Sigma Art. Q-2000) wurde jeweils kurz vor der Behandlung in einer Konzentration von $2,5 \times 10^{-6}$ M in halb Berliner Leitungswasser und halb Aqua destillata, pH 7,2, angesetzt.

Die Dauer des auf die Mutagenbehandlung folgenden Zellzyklus verlängert sich bei UV - Bestrahlung um 6 Stunden auf insgesamt 18 Stunden, bei Quinacrine Mustard - Behandlung um 9 Stunden auf 21 Stunden (siehe auch Abb. 1).

Abb. 1 Der zeitliche Ablauf der neun Versuchsansätze pro Linie

Kontrolle	a	(12h)	- - - - -	(12h)	+ 3h Colchizin	
	b	Coffein	(16h)	- - - - -	(12h) + 3h Colchizin	
	c	(12h) Coffein	- - - - -	(16h)	+ 3h Colchizin	
UV	a	(11h) UV	- - - - -	(18h)	+ 3h	
	b	Coffein	(15h) UV	- - - - -	(18h) + 3h	
	c	(11h) UV	Coffein	- - - - -	(21h) + 3h	
QM	a	(11h) QM	- - - - -	(21h)	+ 3h	
	b	Coffein	(15h) QM	- - - - -	(21h) + 3h	
	c	(11h) QM	Coffein	- - - - -	(24h) + 3h	

1. Zellzyklus mit BrdU/FdU/Urd 2. Zellzyklus mit Thym/Urd

2.2.2.3. Coffein - Zugabe

Eine 5×10^{-4} M Coffeinlösung (Coffein: Serva Art.-Nr. 17 415) wurde entweder während des gesamten ersten oder des gesamten zweiten Zellzyklus, d.h. vor oder nach der Mutagenbehandlung verabreicht. Diese Versuchsansätze werden in den folgenden Tabellen und Abbildungen als "b" (vor) beziehungsweise "c" (nach) bezeichnet die zugehörigen Kontrollen als "a". Die drei zu vergleichenden Linien von *Vicia faba* wurden stets parallel behandelt in je einer Wiederholung. Eine Übersicht über die neun Versuchsansätze pro Linie ist in Abbildung 1 gegeben, aus der auch hervorgeht, daß Coffein eine Verlängerung des Zellzyklus um 3 - 4 Stunden bewirkt!

2.2.3. Präparation und Auswertung

2.2.3.1. Schwesterchromatiden - Austausch

Die Fluoreszenz - Plus - Giemsa Methode (Übersicht bei WOLFF 1977, LATT 1979, PERRY 1980) als Voraussetzung für die SCE - Untersuchung umfaßt -angewandt auf *Vicia faba*- folgende Schritte:

- Spülen der fixierten Wurzelspitzen in 45%-iger Essigsäure und quetschen auf sauberem Objektträger
- Absprengen der Deckgläschen mit Hilfe der Trockeneismethode
- Hydratisieren der Präparate in einer Alkoholreihe (96, 70, 50, 30% und Aqua destillata)
- 45 Minuten inkubieren in einer Lösung von 0,01% RNase (Sigma Art.R-4875) und 5×10^{-5} % Bisbenzamid (Serva Art.-Nr.15 090 bei Raumtemperatur
- Waschen in 0,5 x SSC und 1 h mit UV - Licht (Osram HNS 30 W ofr, 254 nm) bestrahlen.
- Inkubieren der Präparate im Wasserbad bei 60 °C für eine Stunde

- 12 Minuten färben in Giemsalösung (3% Giemsafarbe in M/15 - Puffer, pH 6,8), dann in M/15 - Puffer waschen und lufttrocknen lassen.
- Auswerten der gefärbten Präparate im Lichtmikroskop.

Pro Ansatz und Linie wurden die SCE's von 50 M - Chromosomen und 250 S- Chromosomen analysiert. Diese Anzahl entspricht 25 kompletten Zellen.

2.2.3.2. Chromosomen - Aberrationen

Die fixierten Wurzelspitzen wurden für die Aberrationsauswertung nach der FEULGEN - Methode gefärbt und anschließend auf Objektträger gequetscht. Pro Wiederholung wurden zehn Wurzelspitzen ausgewertet, indem von jedem Präparat fünfzehn Metaphasen auf Aberrationen untersucht wurden. Somit ergeben sich für jeden Versuchsansatz auf Grund der einmaligen Wiederholung 300 ausgewertete Zellen.

Aus zwei Gründen fanden ausschließlich Reunionsfiguren Berücksichtigung. Erstens sind Exchange - Aberrationen ohne Zweifel Ausdruck der Mutagenwirkung auf die DNS, wohingegen einfache Brüche auch durch starkes Quetschen bei der Präparation der Wurzelspitzen hervorgerufen werden können. Zweitens sind die Bruch - und Reunionsereignisse bei Exchange - Aberrationen den Vorgängen formal vergleichbar, die der SCE - Entstehung in der Mitose und der Chisama - Bildung in der Meiosis zugrundeliegen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Der Schwesterchromatiden - Austausch

3.1.1. Häufigkeit des SCE

In den Tabellen I und II sind -getrennt nach M- und S-Chromosomen- die beobachtete SCE - Häufigkeitsverteilung für die jeweils neun Versuchsansätze pro Linie aufgelistet, ferner die Summen- und Mittelwerte samt Standardabweichungen.

Da eine Normalverteilung nicht für alle Ansätze vorausgesetzt werden kann, sollte keine Varianzanalyse, sondern ein parameterfreier Test angewandt werden, um zu prüfen, ob eine unterschiedliche Reaktion der drei Linien auf die Mutagen- bzw Coffeinbehandlung zu verzeichnen ist. Der G - (2I-) Test bietet die Möglichkeit einer dreifachen Klassifikation nach:

- erstens den Linien (Standard, A 16 und A 8)
- zweitens der Mutagenbehandlung (Kontrolle, UV-Bestrahlung und Behandlung mit Quinacrine Mustard)
- drittens der Coffeinbehandlung (ohne bzw nach oder vor der Mutagenbehandlung)

Die zu vergleichenden Summenwerte der einzelnen Versuchsansätze wurden in eine 3 x 3 x 3 Felder - Tafel eingetragen. Zunächst wurde geprüft, ob die drei Einflüsse (Linien Mutagene und Coffein) voneinander unabhängig auf die SCE-Bildung wirken, dann durch die Zerlegung der Informationsstatistik, ob die Mutagene bzw das Coffein unterschiedlich auf die drei Linien wirken.

In Tabelle III sind die zu prüfenden Hypothesen und die dazu errechneten G -Werte zusammengestellt - getrennt für M - und S - Chromosomen. Liegt ein G - Wert unter demjenigen χ^2 - Tafelwert, der in Abhängigkeit von der Anzahl der Freiheitsgrade bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit = 0,05

TABELLE I Zahl der Schwesterchromatid - Austausche auf den metazentrischen Chromosomen

[illegible]

n = Anzahl der untersuchten M - Chromosomen

$x =$ Summe der SCE aller M - Chromosomen

$\bar{x}$ = durchschnittliche SCE - Rate pro M - Chromosom

s = Standardabweichung zu x

TABELLE II Zahl der Schwesterchromatid - Austausch auf den subtelozentrischen Chromosomen

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	n	x	$\bar{x}$	s
Kontrolle	St a	56	96	57	29	10	2								250	347	1,388	1,12
	b	45	105	66	27	7									250	346	1,384	0,99
	c	47	87	84	27	5									250	356	1,424	0,98
	A8 a	39	86	88	29	8									250	381	1,524	1,00
	b	36	86	81	33	11	3								250	406	1,624	1,10
	c	26	95	84	37	8									250	406	1,624	0,97
	A16 a	32	103	81	21	9	3	1							250	385	1,540	1,06
CV	b	41	88	79	36	6									250	378	1,512	1,01
	c	34	110	75	26	4	1								250	359	1,436	0,94
	St a	2	16	36	65	70	40	13	5	2	0	1			250	902	3,608	1,49
	b	1	17	45	56	62	40	16	12	1					250	911	3,644	1,55
DM	c	3	16	43	66	78	28	13	3						250	851	3,404	1,37
	A8 a	9	28	57	63	56	23	8	4	2					250	762	3,048	1,53
	b	5	22	51	69	66	26	8	3						250	794	3,176	1,37
	c	2	11	41	58	69	44	18	6	1					250	921	3,684	1,44
	A16 a	2	17	33	47	74	47	20	7	3					250	948	3,792	1,54
	b	4	14	43	66	70	33	18	2						250	865	3,460	1,39
	c	1	9	32	59	72	45	22	7	2	0	1			250	970	3,880	1,48
	St a	1	2	6	20	45	63	55	32	19	5	1	0	1	250	1592	6,368	1,70
OM	b	1	3	6	16	61	78	49	24	9	3				250	1508	6,032	1,45
	c			7	15	33	61	50	55	16	11	2			250	1678	6,712	1,64
	A8 a					6	31	60	69	52	21	10	1		250	1738	6,952	1,39
	b		2	4	20	42	73	66	30	11	2				250	1565	6,260	1,40
	c			1	14	37	74	64	46	13	1				250	1631	6,524	1,29
	A16 a		1	6	22	49	73	58	26	11	4				250	1544	6,177	1,45
	b	1	1	5	20	50	89	50	24	9	1				250	1515	6,060	1,36
	c			4	10	36	80	66	41	12	1				250	1620	6,480	1,28

n = Anzahl der untersuchten S - Chromosomen

 $\bar{x}$ = Summe der SCE aller S - Chromosomen $\bar{x}$ = durchschnittliche SCE - Rate pro S - Chromosoms = Standardabweichung zu $\bar{x}$

ermittelt wird, so ist die 0 - Hypothese anzunehmen, wonach kein signifikanter Zusammenhang zwischen den geprüften Einflüssen vorliegt.

Die SCE - Summen der M - Chromosomen von Standard, A 16 und A 8 sind durch die Mutagen - und / oder Coffeinbehandlung nicht signifikant unterschiedlich beeinflusst worden.

Ebenfalls einheitlich reagieren die S - Chromosomen auf die Coffeinzugabe, nicht hingegen auf die Mutagene. Dieser Unterschied kommt dadurch zustande, daß nach UV - Bestrahlung die S - Chromosomen der Mutante A 8 mit dem geringsten Anstieg der SCE - Rate reagieren (Σ 762, $\bar{x}$ = 3,05) nach der Quinacrine Mustard Behandlung den größten Anstieg verzeichnen (Σ 1738, $\bar{x}$ = 6,95). Dies ist offenbar der Grund für den unterschiedlichen Einfluß der Mutagene auf die Linien. Unter zusätzlicher Berücksichtigung des Coffeieinflusses ist die Mutagenwirkung auf die Linien wieder einheitlich. (siehe Tabelle III)

Die SCE - Frequenzen aller drei Vicia - Linien sind in UV-bestrahlten Zelle (Abb. 2 b) annähernd verdoppelt verglichen mit nicht - mutagen behandelten Kontrollen (Abb. 2 a), in Quinacrine Mustard - ausgesetzten Zellen findet sich etwa die vierfache Menge an SCE's. Die Multiplikationsfaktoren sind im Einzelnen in der Abbildung 3 angegeben, in der SCE - Raten auf komplette Zellen bezogen sind. Diese Daten sind abgeleitet, da vorwiegend Einzelchromosomen ausgewertet wurden. Die Versuchsansätze a, b und c konnten zusammengefaßt dargestellt werden, da Coffein weder vor noch nach einer Mutagenbehandlung die SCE - Raten deutlich in eine bestimmte Richtung beeinflusst.

TABELLE III

Daten des Schwesterchromatiden - Austauschs im G - Test

a) M - Chromosomen

		Coffeinzugabe			
		a	b	c	
Kontrolle	Standard	195	183	199	577
	A 8	194	184	189	567
	A 16	175	188	192	555
		564	555	580	1699
UV	Standard	385	396	350	1131
	A 8	349	328	352	1029
	A 16	360	377	379	1116
		1094	1101	1081	3276
QM	Standard	683	688	736	2107
	A 8	755	714	736	2200
	A 16	709	729	724	2162
		2147	2131	2191	6469
		3805	3787	3852	11444

		Coffeinzugabe			
		a	b	c	
Standard		1263	1267	1285	3815
A 8		1298	1226	1272	3796
A 16		1244	1294	1295	3833
		3805	3787	3852	11444

Hypothese	FG	G	$\chi^2_{\alpha=0,05}$	
I. Linie x Mutagen x Coffein	20	17,8	31,4	ns
II. Linie x Mutagen	4	8,0	9,49	ns
III. Linie x Coffein	4	3,0	9,49	ns

ns = nicht signifikant, ss = signifikant

TABELLE III (Fortsetzung)

b) S - Chromosomen

		Coffeinzugabe			
		a	b	c	
Kontrolle	Standard	347	346	356	1049
	A 8	381	406	406	1193
	A 16	385	378	359	1122
		1113	1130	1121	3364
UV	Standard	902	911	851	2664
	A 8	762	794	921	2477
	A 16	948	865	970	2783
		2612	2570	2742	7924
QM	Standard	1592	1508	1678	4778
	A 8	1738	1565	1631	4934
	A 16	1544	1515	1620	4679
		4874	4588	4929	14391
		8599	8288	8792	25679

		Coffeinzugabe			
		a	b	c	
	Standard	2841	2765	2885	8491
	A 8	2881	2765	2958	8604
	A 16	2877	2758	2949	8584
		8599	8288	8792	25679

Hypothese	FG	G	$\chi^2_{\alpha=0,05}$	
I. Linie x Mutagen x Coffein	20	68,2	31,4	ss
II. Linie x Mutagen	4	33,2	9,49	ss
III. Linie x Coffein	4	1,2	9,49	ns

ns = nicht signifikant, ss = signifikant

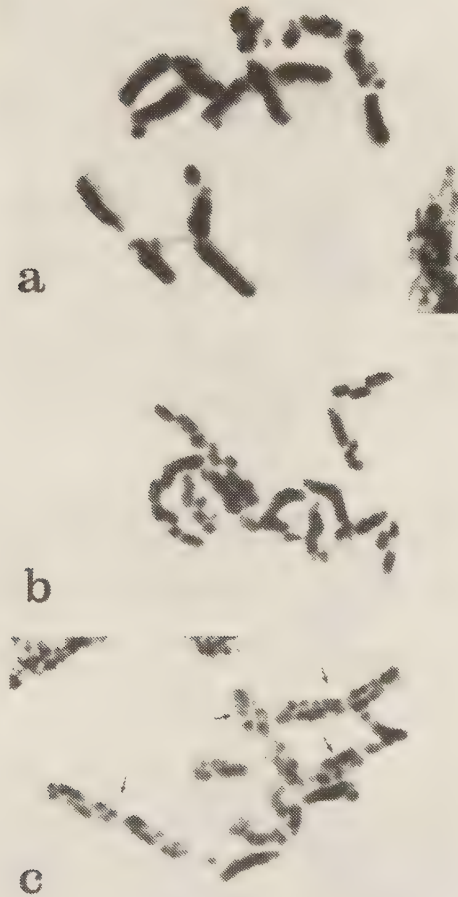


Abb.2 a) Metaphase der Standardform mit 15 SCE's
b) Zelle der Mutante A 8 nach UV-Bestrahlung mit 39 SCE's
c) Metaphase der Mutante A 16 nach Behandlung mit Quinacrine Mustard: auf den M-Chromosomen sind 16 bzw 15 SCE's auf mit Pfeilen bezeichneten S-Chromosomen 6 bzw 5 SCE's erkennbar.

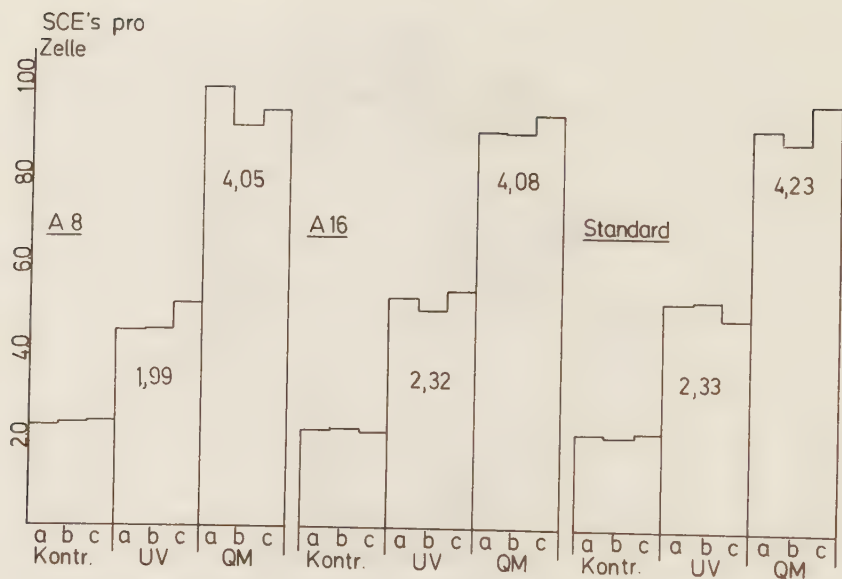
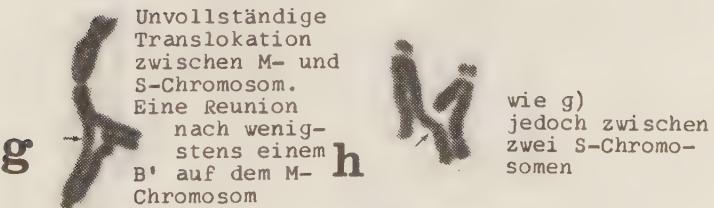
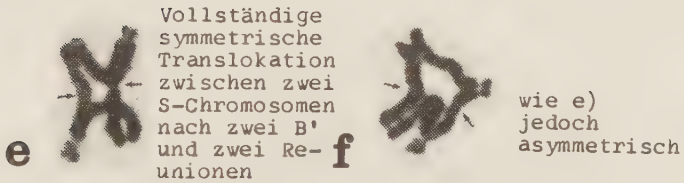
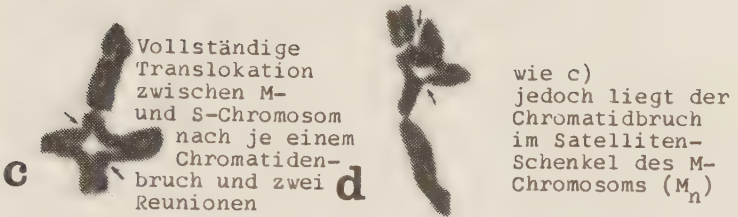
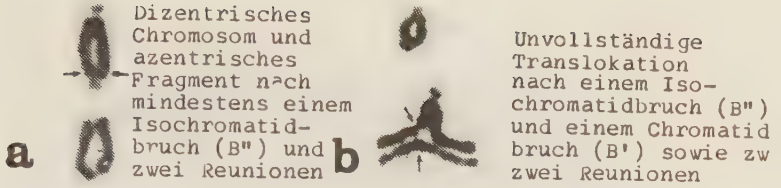


Abb.3 Effekte der Mutagen-Behandlung auf die SCE-Raten

3.2. Die Aberrationen

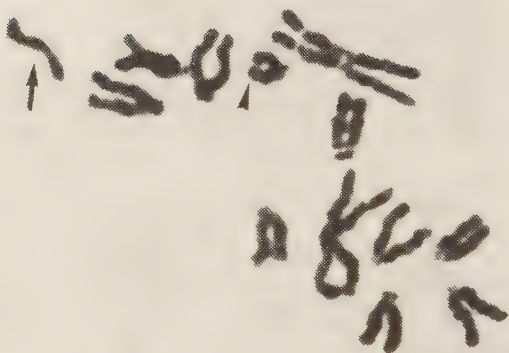
3.2.1. Art der Aberrationen

Die analysierten Aberrationstypen sind in der Abbildung 4 dargestellt. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Chromatiden- (Abb.4 c-1) aber auch um einige Isochromatiden-Reunionen (Abb.4 a-b). Die Chromatiden-Reunionen lassen sich in Interchanges und Intrachanges einteilen, d.h. Reunionen zwischen Chromatiden unterschiedlicher Chromosomen oder Reunion zwischen Schwesterchromatiden (Abb.4 h-1). Sämtliche Aberrationstypen traten sowohl nach UV-Bestrahlung als auch nach Quinacrine Mustard-Behandlung auf (siehe Abb. 5-10). Gaps und einfache Bruchereignisse, wie sie in der Abbildung 11 zu sehen sind, wurden aus den oben angeführten Gründen nicht bei der Auswertung berücksichtigt. In den Kontrollen konnte eine einzige spontane Chromatiden-Translokation beobachtet werden und zwar in der Standardlinie bei Coffein-Nachbehandlung.



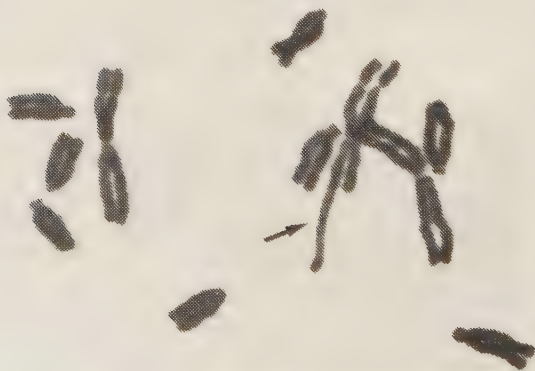
Isochromatidbruch mit
i) zwei und k) einer
intrachromosomaler Reunion

Abb.4



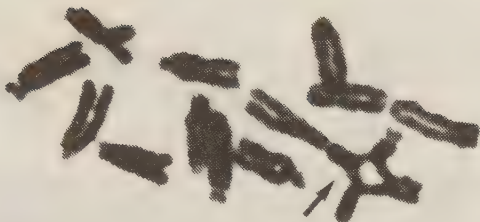
5

Isochromatidbruch (B'') und eine intrachromosomale Reunion der beiden zentromerlosen Chromatidfragmente (→) Das Fragment mit Zentromer (→) weist zwei offene Bruchstellen auf.



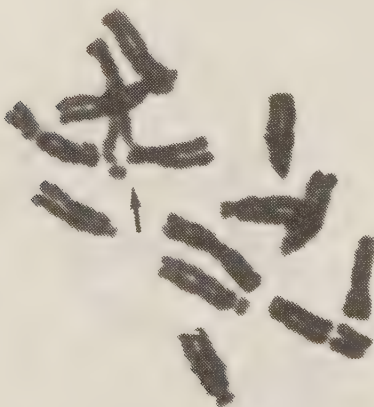
6

Chromatidbruch (B') und intrachromosomale Reunion in einem M-Chromosom ,induziert durch UV-Bestrahlung von Zellen der Standardform



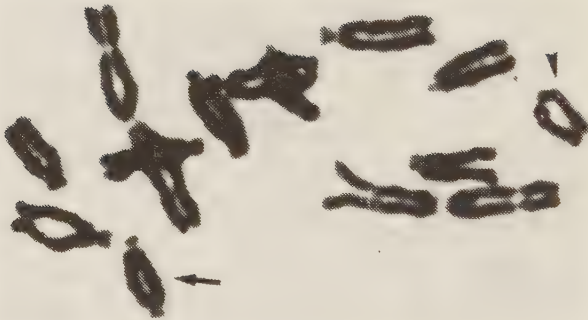
7

Induktion einer vollständigen Chromatidentranslokation ($\rightarrow$) -interchange R"B"- zwischen dem Satellitenarm eines M-Chromosoms und einem S-Chromosom (M_n/S) durch QM und Coffein-Nachbehandlung in einer Zelle der Mutante A 8 .



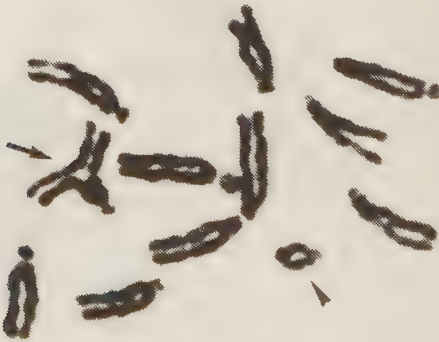
8

Wiederum eine vollständige Chromatidentranslokation, ($\rightarrow$) von der jedoch der zweite Arm des M-Chromosoms betroffen ist (M/S). Die Lesion wurde durch UV-Bestrahlung von Standardzellen hervorgerufen.



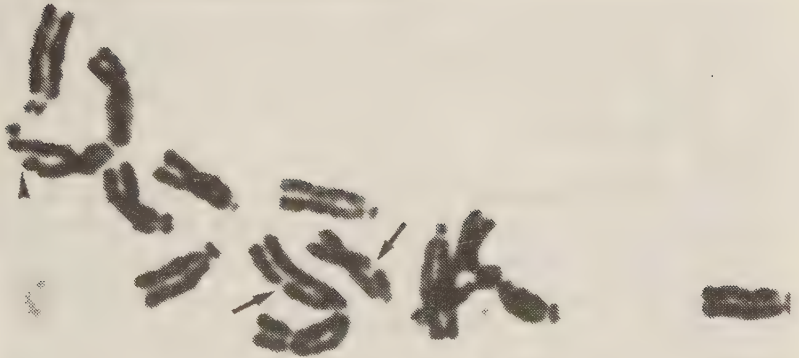
9

Eine Zelle der Standardform nach Behandlung mit QM. Durch einen Isochromatidbruch (B'') in einem S-Chromosom und die Fusion des Fragments mit Zentromer an die distalen Enden eines zweiten S-Chromosoms entstand ein dizentrisches Chromosom (→) und ein azentrisches Fragment (↗).



10

UV-Bestrahlung und Coffein-Vorbehandlung ergab in dieser Zelle der Standardlinie einen Isochromatidenbruch (B'') und einen Chromatidenbruch (B'). Die Reunion der drei azentrischen Stücke ist vollständig (↗). Lediglich die "Isobruchstelle" am Fragment mit dem Zentromer bleibt offen (→).



11

Nicht ausgewertete Aberrationen: Chromatidbruch in einem M-Chromosom (→) und je ein Gap in einem M- und einem S- (→) Chromosom. Zusätzlich befindet sich in dieser Zelle der Standardform, die UV bestrahlt und nachfolgend Coffein behandelt wurde eine nicht zu definierende Translokationsfigur.

3.2.2. Häufigkeit der Aberrationen

3.2.2.1. Mutagenbehandlung (Versuchsansätze "a")

In der Tabelle IV sind Zahl und Art der Aberrationen angegeben, die nach UV - Bestrahlung und den Coffeinzusätzen in *Vicia faba* Standard, A 16 und A 8 auftraten. Tabelle V zeigt die gleichen Daten für die Behandlung mit Quinacrine Mustard.

UV - Licht (Ansätze "a" in Tabelle IV) induzierte in der Standardform knapp 8%, in A 16 2% und in A 8 knapp 1% aberrante Metaphasen. Bis auf eine Zelle von A 16, in der zwei Aberrationen beobachtet wurden, wiesen alle Metaphasen nur eine einzige Schädigung auf.

Die Werte für die Behandlung mit Quinacrine Mustard sind annähernd gleich (Ansätze "a" in Tabelle V): Standard 6%, A 16 2% und A 8 1% Metaphasen mit je einer Aberration.

Die Wiederholungen konnten in allen Fällen zusammengefaßt werden, da sie gut übereinstimmen.

Die Aberrationsraten der Mutanten liegen sowohl nach der Bestrahlung als auch nach der Behandlung mit dem Chemomutagen signifikant unter denen der Standardform. Diese unterschiedliche Reaktion der drei Linien auf die Mutagenbehandlung wird durch den G - Test abgesichert (siehe Tabelle VI).

TABELLE IV Die Exchange - Aberrationen nach UV - Bestrahlung

Aberrationstypen (nur Exchange-Konfigurationen)													
		Anzahl aberranter Metaphasen		Anzahl der Aberrationen		R"B"		interchanges		R'B"		intrachanges R"B" R'B" R'B'	
		M _n /M	M/M	M _n /M	M _n /S	M/S	M/S	S/S	M _n /S	M/S	S/S	S	M
A 8	a	1	(0,7%)	1				1					
	b	1	(0,7%)	1				1					
		0											
		0											
	c	4	(2,7%)	4		3					1		
		2	(1,3%)	2				1			1		
A 16	a	3	(2,0%)	3			1	2					
		3	(2,0%)	4	(2,7%)	1		2			1		
	b	0											
		0											
	c	6	(4,0%)	6		2	1	2				1	
		6	(4,0%)	6		1	3	2					
Stand. a	11	(7,3%)	11										
	12	(8,0%)	12		1	1	1	4	1	2	2	2	1
								8					
	b	4	(2,7%)	4				3				1	
		6	(4,0%)	6				6					
	c	20	(13,3%)	22	(14,7%)	1		12	1		4		
	25	(16,7%)	27	(18,0%)	1	5	4	14		1	2		
						3	0	13	14	58	1	2	11
												2	4
												1	

TABELLE VI

Daten der Aberrationen im G - Test

		Coffeinzugabe			
		a	b	c	
Kontrolle	Standard	0	0	1	1
	A 8	0	0	0	0
	A 16	0	0	0	0
		0	0	1	1
UV	Standard	23	10	49	82
	A 8	2	0	6	8
	A 16	6	0	12	18
		31	10	67	108
QM	Standard	18	4	79	101
	A 8	3	3	14	20
	A 16	7	5	29	41
		28	12	122	162
		59	22	190	271

		Coffeinzugabe			
		a	b	c	
Standard		41	14	129	184
A 8		5	3	20	28
A 16		13	5	41	59
		59	22	190	271

Hypothese	FG	G	$\chi^2_{\alpha=0,05}$	
I. Linie x Mutagen x Coffein	20	143,4	31,4	ss
II. Linie x Mutagen	4	30,4	9,49	ss
III. Linie x Coffein	4	0,8	9,49	ns

ns = nicht signifikant, ss = signifikant

3.2.2.2. Vorbehandlung mit Coffein (Versuchsansätze "b")

Coffeinzugabe vor der Mutagenbehandlung wirkt reduzierend auf die Aberrationsraten aller drei Linien. Das gilt für UV - Licht und für Quinacrine Mustard, wobei jedoch quantitative Unterschiede festzustellen sind. Am deutlichsten kann dies an der Standardform studiert werden, da hier die höchsten Aberrationsraten zu verzeichnen sind, bei den Mutanten dagegen nur sehr geringe. Coffeinzugabe vor der UV - Bestrahlung vermindert die Rate der Exchange - Aberrationen um das 2,3-fache, vor der Quinacrine Mustard-Behandlung um das 4,6-fache. Das bedeutet eine Verdopplung des Effekts von Coffein auf die Quinacrine Mustard - induzierte Aberrationsrate gegenüber der durch UV - Licht ausgelösten (Abb. 12).

Auch bei A 8 und A 16 läßt sich eine Tendenz zur Reduktion der Aberrationsraten ablesen. Der G - Test (Tabelle VI) bestätigt die einheitliche Wirkung des Coffein auf die drei Linien.

3.2.2.3. Nachbehandlung mit Coffein (Versuchsansätze "c")

Der Zusatz von Coffein nach der jeweiligen Mutagenbehandlung verdoppelt in den drei Linien die durch UV - Licht ausgelöste Aberrationsrate und vervierfacht die durch Quinacrine Mustard induzierte (Abb. 12). Diese Effekte sind rein quantitativ vergleichbar mit denen im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Coffeineffekten. Der die Aberrationsrate steigernde Faktor entspricht größtmäßig dem Reduktionsfaktor bei der Coffein - Vorbehandlung. Zudem ist beides -Erhöhung wie Reduktion- in gleicher Weise vom jeweils angewandten Mutagen abhängig.

Die Multiplikations- und Divisionsfaktoren in der Abbildung 12 sind bezogen auf die Anzahl der Aberrationen pro 100 Metaphase, nicht auf die Anzahl aberranter Metaphasen! Diese beiden Rubriken in den Tabellen IV und V weisen für die Standardform Unterschiede auf: Coffeinzugabe nach UV - Bestrahlung ergab 4 doppelt geschädigte Zellen, nach Quinacrine Mustard - Behandlung 6 doppelt und eine dreifach geschädigte Zelle.

Die Coffeinwirkung auf die drei Linien ist nicht unterschiedlich, wie der G - Test ausweist (Tabelle VI).

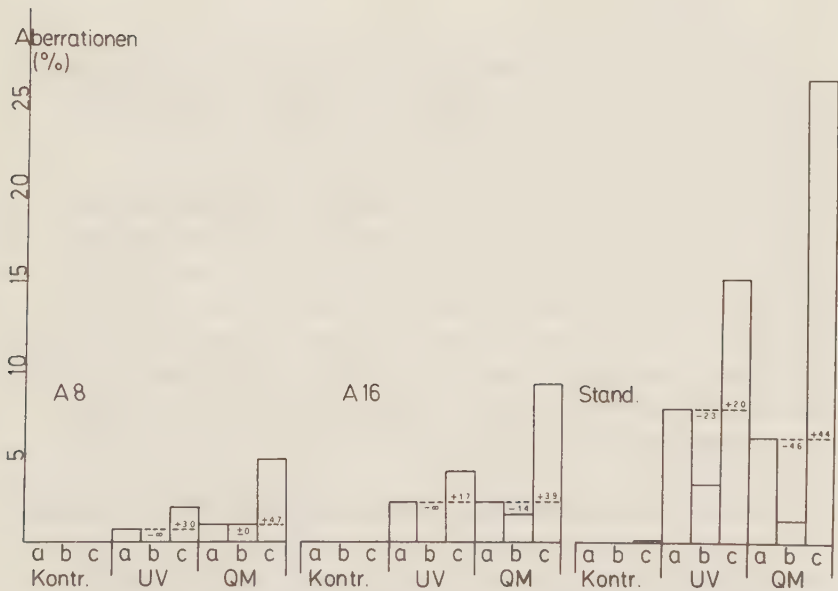


Abb.12 Effekte der Mutagen- und der Coffeinbehandlungen auf die Aberrationsraten

4. DISKUSSION

4.1. Formaler Ablauf der drei Phänomene Crossing-over, Schwesterchromatiden-Austausch und Exchange-Aber- ration

Crossing-over, Schwesterchromatiden-Austausch und Exchange-Abrerrationen beruhen allesamt auf Bruch und Reunion doppelsträngiger DNS, wobei Crossing-over ein natürlicher, genetisch determinierter Prozeß ist, dagegen SCE und Exchange-Abrerrationen pathologische Erscheinungen sind, denen ein Defekt auf der DNS vorausgeht.

4.1.1. Crossing-over

Der Vorgang der meiotischen Rekombination, das Crossing-over, ist ein reziproker Austausch zwischen homologen Chromosomen.

Nach einem Modell von HOLLIDAY, dessen Grundzüge aus dem Jahre 1964 stammen, beginnt die Rekombination durch einen Einzelstrangbruch an gleichen Loci auf den homologen Chromatiden. Diese Brüche befinden sich auf den DNS-Strängen gleicher Polarität, die-überkreuz rekombiniert- ein Halbchromatid - Chiasma bilden, die sogenannte HOLLIDAY - Struktur. Im zweiten Schritt wird das Croosing-over durch Bruch und Reunion der bis dahin unbeteiligten Stränge komplettiert.

Den einzelnen hier stark vereinfacht dargestellten Schritten entsprechend konnten bei verschiedenen Objekten die notwendigen Enzyme nachgewiesen werden (BOSTOCK and SUMNER, 1977). Auf Grund dessen erstellte STERN (1980) ein Modell der meiotischen Rekombination, welche insbesondere die Rolle der im Pachytän synthetisierten DNS (P-DNS) berücksichtigt, grundsätzlich aber mit der HOLLIDAY - Hypothese übereinstimmt.

Damit es jedoch überhaupt zum Austausch kommt, ist eine spezielle Paarungsstruktur, der sogenannte Synaptonemale Komplex (SC) notwendig. Dieser wird in der frühen meiotischen Prophase zwischen den Austausch-Partnern gebildet, und hat die Aufgabe, die Partner einander zu nähern und im Pachytän zusammenzuhalten. Während des Pachytän-Stadiums ist Rekombination von DNS möglich. Ein erfolgtes Crossing-over manifestiert sich nach der Auflösung des Synaptonemalen Komplex im Diplotän als Chiasma. Die Chiasmafrequenz ist artspezifisch und genetisch festgelegt. *Vicia faba* bildet etwa 20 Chiasmata pro Zelle.

4.1.2. Schwesterchromatiden - Austausch

SCE ist reziproker Austausch zwischen identischen Chromatiden und entsteht immer im Zusammenhang mit einer DNS-Replikationsphase aus einer Primärläsion (EVANS 1977, NATARAJAN 1982). Während die Schwesterchromatiden in der S-Phase entstehen, dürften beste Voraussetzungen für die offenbar reziproken Bruch und Reunionsereignisse des SCE gegeben sein. Bei *Vicia faba* können, artspezifisch, ca. 20 SCE's pro Zelle gezählt werden.

SCE ist als Spontanereignis von B. McCLINTOCK im Jahre 1938 an Ringchromosomen des Mais nachgewiesen worden. Andererseits ist das zur SCE-Analyse notwendige Bromdesoxyuridin, welches als Mutagen und Teratogen bekannt ist, in der Lage SCE zu induzieren. Experimente mit variiertem BrdU-Konzentration haben dies eindeutig ergeben (LATT, 1981).

BERND FRIEBE et al. (1982) konnten bei Roggen feststellen, daß kein Unterschied in der SCE - Frequenz zutage tritt, wenn statt in nur einem während zweier Zellzyklen BrdU verabreicht wird. BrdU wirkt hier nicht SCE-induzierend.

Dagegen beobachteten SCHVARTZMAN und CORTES (1977) eine Verdopplung der SCE-Raten von *Allium cepa* nach zwei Zyklen in Anwesenheit von BrdU gegenüber nur einem Zyklus.

Vermutlich liegt bei den gezählten 20 SCE's pro Vicia-Zelle eine Mischung aus spontan entstandenen und BrdU-induzierten Schwesterchromatid-Austauschen vor.

4.1.3. Exchange-Aberrationen

Analysierbare Exchange-Aberrationen sind nicht-reziproke Austausche zwischen Chromosomen. Zur Genese von Exchange-Aberrationen existieren unterschiedliche Theorien. Die bekanntesten sind die "breakage-first" Theorie (STADLER, 1931) und die "contact-first" Theorie (SEREBROVSKY, 1929), aus denen Varianten wie die "breakage-reunion" Theorie (SAX, 1940/41) und die "exchange" Theorie (REVELL 1955, 1959) bzw die Theorie von DEMIN und ELISOVA (1971) entstanden sind.

Die Modelle unterscheiden sich durch unterschiedliche Auffassung über die Art der Primärschäden, aus denen sich die im Lichtmikroskop sichtbaren strukturellen Chromosomen-Aberrationen entwickeln. Während die "breakage-first" Theorie als Primärereignis einen DNS-Einzelstrangbruch postuliert, geht die "contact-first" Theorie davon aus, daß zunächst ein geringerer DNS-Schaden auftritt. Nähern sich zwei solcher Schadensregionen, die auf völlig verschiedenen Chromosomen lokalisiert sein können, an, so ergibt sich die Möglichkeit eines Austauschs. Auf diese Weise werden grundsätzlich nur Exchange-Aberrationen gebildet, lediglich im Falle eines unvollständigen und fehlerhaften Austauschs entsteht ein Bruch.

Gemeinsam aber setzen beide Theorien voraus, daß nach der Induktion eines Primärschadens auf einem DNS-Einzelstrang

in einem zweiten Schritt die gesamte DNS - Doppelhelix durch Bruch und Reunion an der Bildung von Exchange - Aberrationen beteiligt ist.

Exchange - Aberrationen entstehen spontan nicht oder nur sehr selten. Die Austauschpartner finden sich offenbar zufällig. Bei *Vicia faba* wurden keine Spontan-Aberrationen beobachtet.

4.2. Die allgemeine Wirkungsweise der Agentien

4.2.1. Die Wirkung des UV -Lichts

UV -Licht ist mit Energiequanten zwischen 10 und 20 Elektronenvolt (eV) im Vergleich zur Röntgenstrahlung mit 30-60 eV energiearm.

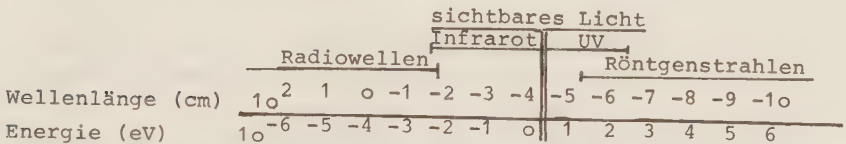


Abb.13 Wellenlängen und Energiequanten des UV-Lichts im Spektrum der elektromagnetischen Strahlung

Diese relativ geringen Energiequanten werden nicht gleichmäßig von allen betroffenen Molekülen eines Objekts absorbiert, sondern nur an den Chromophoren, die sich beispielsweise an den Nukleinsäuren und den Proteinen befinden (LASKOWSKI, 1981). Die Konzentration der UV-Strahlung auf bestimmte Regionen einer Zelle ermöglicht die Induktion von Schäden an der Desoxyribonukleinsäure.

Dabei sind zwei Kategorien von Schäden zu unterscheiden: erstens solche, die auf nativer DNS entstehen können und zweitens Lesionen, die nur auf BrdU-substituierter DNS induziert werden.

Native DNS reagiert nachgewiesenermaßen nur mit ihren Pyrimidin-Basen auf UV-Licht und zwar mit der Bildung von Dimeren, Addukten und Hydraten. Von den UV-induzierten Lesionen sind die Dimere sicherlich die wichtigsten und zudem diejenigen, deren Entstehung und mögliche Reparatur am besten untersucht ist. Die Hälfte aller Pyrimidin-Dimere entsteht zwischen zwei benachbarten Thymin-Basen, je ein Viertel sind vom Cytosin-Cytosin bzw Cytosin-Thymin Typus. Diese auch als Photoprodukte bezeichneten DNS - Primärlesionen können mittels eines spezifischen Reparaturmechanismus korrigiert werden. Unter Lichteinwirkung in Verbindung mit einem Photoenzym werden Dimere monomerisiert. Daher wird dieser Reparatur-Vorgang als Photo-reaktivierung oder auch als UV-Reparatur bezeichnet.

UV-Licht produziert nach ROMMELAERE (1973) auf nativer DNS auch Schäden, die zum SCE führen. Ob diese Lesionen Pyrimidin-Dimere sind, ist umstritten:

WOLFF (1978) berichtet von unveränderten SCE-Raten trotz Reduzierung der Dimer-Anzahl und verweist zudem (WOLFF, 1977) auf Versuche mit repairdefekten Zellen des Chinesischen Hamsters und vor allem mit Xeroderma-Pigmentosum (XP) Zellen. Nach UV-Bestrahlung zeigten diese Zelllinien keine von der jeweiligen Normalform abweichenden SCE-Frequenzen, obwohl doch Pyrimidin-Dimere hier häufiger sein müßten. Denn ein Photorepair und damit die Monomerisierung entstandener Dimere ist im Fall des Chinesischen Hamsters auf Grund eines Defekts im UV-Reparatursystem nicht möglich und im Fall der XP-Zellen ebenfalls nicht, da diese nicht dem sichtbaren Licht ausgesetzt werden dürfen. WOLFF schließt daher eine Beteiligung von Dimeren an der SCE-

Genese aus.

Andere Autoren können jedoch dem widersprechende Befunde vorlegen. KATO (1974 b) fand an Zelllinien der Känguruh-Ratte bei reduzierter Dimerzahl eine verminderte SCE-Frequenz. Ähnliche Experimente von ISHIZAKI et al., (1980) und von NATARAJAN et al., (1980) konnten die Richtigkeit der von KATO gemachten Beobachtungen bestätigen und einen direkten Zusammenhang zwischen der SCE-Rate und der Menge der induzierten Dimere herstellen. Vergleichbare Untersuchungen an pflanzlichem Material fehlen leider.

Auf BrdU-substituierter DNS bewirken UV-Quanten durch die Photolyse des anstelle von Thymidin eingebauten BrdU Gaps und Brüche in DNS-Einzelsträngen. Daraus entwickeln sich mit der nächsten Replikationsrunde Exchange-Aberrationen und viele zusätzliche SCE's. In welcher Menge diese Art von Primärschäden gebildet werden hängt von der Menge des in die DNS aufgenommenen BrdU und von der Anzahl der substituierten Einzelstränge ab, letzteres also davon, ob ein oder zwei Zyklen lang in Anwesenheit von BrdU repliziert wurde.

Sichtbare Chromosomen-Aberrationen können mittels UV-Licht nur auf BrdU-substituierter DNS induziert werden!

SCE's dagegen werden sowohl auf nativer als auch auf BrdU-substituierter DNS gebildet.

4.2.2. Die Wirkung des Quinacrine-Mustard

2-Methoxy-6 Chlor-9 (3 Äthyl-2 Chloräthyl-) Aminopropyl-amino - Acrine dihydrochlorid, auch als Quinacrine Mustard oder ICR 170 bezeichnet, wurde bekannt durch Verwendung in den Experimenten von T. CASPERSSON Ende der sechziger Jahre, mit denen die Entwicklung der heute gebräuchlichen

Techniken zur Bänderung von Chromosomen begann. Die Substanz besteht aus einem Fluorchrom (Acridine) mit einem als Seitenkette angebundenem Nitrogen Mustard, der ein monofunktionelles alkylierendes Agens darstellt.

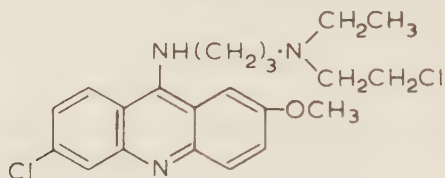


Abb.14 Die Struktur-Formel des Quinacrine Mustard

Diese Verbindung sollte - so CASPERSSON's Theorie - durch Alkylierung des Stickstoffs an der 7. Position des Guanin an die DNS binden. Die Fluorchrom-Komponente sollte dann die Guanin-Cytosin-reichen Regionen eines Chromosoms anfärben und im Mikroskop sichtbar werden lassen, während Adenin-Thymin-reiche Abschnitte ungefärbt bleiben. Allerdings ergibt die Anwendung von Quinacrine dihydrochlorid die gleichen Fluoreszenz-Bänderung wie Quinacrine Mustard. Quinacrine dihydrochlorid besitzt jedoch keine alkylierenden Eigenschaften! Damit kann die Alkylierung des Guanin durch Quinacrine Mustard als Ursache für die Chromosomen-Banden ausgeschlossen werden. Es besteht ferner Grund zur Annahme, daß Quinacrine Mustard wegen seines Acridine-Rings nicht mit dem N⁷ des Guanin reagieren kann (KIHLMAN, 1977). Acridine Farbstoffe sind als interkalierende Substanzen bekannt. Ein Einschieben zwischen die Basen, was zu frame-shift Mutationen führt, dürfte aber kaum die beobachteten Chromosomen-Aberrationen auslösen. Sicher ist heute, daß Quinacrine Mustard über eine Seitenkette mit der DNS kovalent bindet und zwar bevorzugt in Adenin-Thymin-reichen Abschnitten eines Chromosoms. Es zeigte sich nämlich

daß - entgegen der Vorstellung CASPERSSON's - die Fluoreszenz-Banden A-T und nicht G-C reich sind (KIHLMAN, 1977).

Trotz der nicht endgültig geklärten Reaktionsweise ist Quinacrine Mustard mehrfach mit Erfolg zur Induktion von strukturellen Chromosomen-Aberrationen und von SCE's herangezogen worden (KIHLMAN and STURELID, 1978).

Die Wirkung entspricht der eines monofunktionellen alkylierenden Agens: Primärschäden können zu jedem Zeitpunkt des Zellzyklus induziert werden. Strukturelle Chromosomen-Aberrationen werden nach Induktion in der G1- oder der S-Phase bereits in der darauffolgenden Mitose, nach Induktion in der G2 erst in der zweiten Mitose sichtbar. Quinacrine mustard zeigt damit den für alkylierende Agentien und auch für UV-Strahlen typischen "delayed effect" bei der Genese struktureller Chromosomen-Aberrationen. Solche Agentien werden auch als S-Phase abhängig wirkende Mutagene bezeichnet.

4.2.3. Die Wirkung des Coffein

Coffein als stimulierender Bestandteil von bereits jahrhundertlang bekannten und beliebten Genußmitteln wie Tee oder Kaffee wurde erstmals 1820 von FERDINAND RUNGE beschrieben. EMIL FISCHER erkannte 1897, daß Coffein ein 1,3,7-Trimethylxanthin ist, wobei Xanthin wiederum ein zweifach oxydiertes Purin darstellt. Coffein ist also ein Purinderivat, verhält sich aber zumindest in Bakterien-DNS nicht als Purinbasen-Analogon (DELVAUX et al., 1969).

Viele Organismen zeigen nach Coffein-Applikation eine Zellzyklus Verzögerung, was offensichtlich unterschiedliche Ursache hat je nach dem ob Coffein allein oder in Kombination mit Mutagenen verabreicht wird. Coffein allein an-

gewandt verlängert, wie an Mäusezellen gefunden wurde, die beiden Gap-Phasen des Zellzyklus. Im Zusammenspiel mit UV-Licht wirkt Coffein auf die gleichen Zellen S-Phase-verzögernd während G 1 und G 2 normal verlaufen. Ausserdem wurde entdeckt, daß Coffein in Konzentrationen ab 1% die Aufnahme von DNS-Basen-Vorläufern in die Zelle hemmt. Die S-Phasen-Verzögerung durch Coffein scheint ein komplexer Vorgang zu sein, der nicht klar von der ebenfalls verzögernden Wirkung eines gleichzeitig zugegebenen Mutagens zu trennen ist. (TIMPSON, 1977)

Aus der lediglich potenzierenden Wirkung des Coffein ergibt sich für KIHLMAN (1977) der Schluß, daß Aberrationen nicht direkt mit Hilfe von Coffein ausgelöst werden können, sondern indirekt über die Verminderung der Reparaturmöglichkeiten einer Zelle. Während in Bakterien wie z.B. *Escherichia coli* praereplikative Reparaturprozesse betroffen sind, werden in Pflanzen- und Tierzellen postreplikative Reparaturvorgänge gehemmt. Letzteres konnte aus der Beobachtung abgeleitet werden, daß Coffein in Verbindung in Verbindung mit einem Mutagen die S-Phase verlängert und währenddessen die durch das Mutagen induzierte Aberrationsrate potenziert. Dies erscheint nur durch die Hemmung eines in diesem Stadium ablaufenden Reparaturmechanismus möglich, nämlich einer Postreplikationsreparatur, der eine Rekombination von identischer DNS zu Grunde liegen soll.

Inwieweit Schwesterchromatid-Austausche, die oft als Ausdruck einer solchen postreplikativen Rekombinationsreparatur angesehen werden, von der Coffein-Behandlung beeinflusst werden soll weiter unten betrachtet werden.

4.2.4. Zusammenfassung

Sowohl UV-Licht und Quinacrine Mustard als auch Coffein rufen, nachdem die betroffenen Zellen eine S-Phase durch-

laufen haben, strukturelle Chromosomen-Aberrationen hervor. Dabei wirkt Coffein indirekt mutagen, indem es die Reparatur von DNS-Schäden verhindert, die zuvor von direkten Mutagenen ausgelöst worden sind. UV-Licht und Quinacrine Mustard sind S-Phase abhängige, direkte Mutagene, die in der Lage sind, DNS-Primärschäden zu induzieren, welche sich -sofern nicht repariert- zu sichtbaren Aberrationen und zu SCE's entwickeln können.

Ob Aberration und Schwesterchromatiden-Austausch auf unterschiedlichen oder auf gleichen Primärereignissen beruhen, konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden. Diese Frage soll im Folgenden noch behandelt werden.

4.3. Die spezielle Wirkungsweise der Agentien

Nicht S-Phase abhängig wirkende Mutagene wie Röntgen- oder Gamma-Strahlen induzieren vorwiegend nicht reparabele DNS-Doppelstrangvrüche und beeinflussen die SCE-Raten nicht oder nur unerheblich. S-Phase abhängige Mutagene produzieren reparierbare Primärschäden, die sich zu strukturellen Aberrationen, hauptsächlich vom Exchange-Typ- entwickeln können. Zudem steigern sie die SCE-Raten beträchtlich. Zur Entwicklung sowohl der Exchange-Aberrationen als auch der SCE's ist eine DNS-Synthese-Phase notwendig. Die Vermutung liegt nahe, daß zumindest bei Induktion durch S-Phase abhängige Agentien die Vorgänge zur Entwicklung von Exchange-Aberration und SCE vergleichbar sind und zwar sowohl hinsichtlich der Primärschäden als auch der S-Phase abhängigen Bildung beider.

4.3.1. Die spezielle Wirkungsweise von UV-Licht und Quinacrine Mustard

Vergleicht man die Wirkung von UV-Licht und Quinacrine Mustard auf die drei Linien von *Vicia faba*, so findet man,

daß beide Induktoren etwa gleich viele Exchange-Aberrationen hervorrufen, die SCE-Raten dagegen je nach Induktor verschieden sind: UV-Bestrahlung erhöht die SCE-Rate um das Zwei- bis Dreifache, Quinacrine Mustard-Behandlung um das Fünffache. Daraus läßt sich ableiten, daß entweder SCE-auslösende Primärereignisse nicht nur sehr viel häufiger, sondern auch von anderer Qualität sind als solche die zu Exchange-Aberrationen führen oder daß die weitere Entwicklung beider unterschiedlich ist z.B. im Hinblick auf eine mögliche Reparatur der Primärschäden.

4.3.2. Die spezielle Wirkungsweise des Coffein

Erkenntnisse über Gemeinsamkeiten oder Unterschiede während der weiteren Entwicklung von Exchange-Aberrationen und SCE nach der Induktion der Primärschäden können aus den Daten der Coffein-Experimente gewonnen werden, da das in der S-Phase wirksame Coffein über die Rekombinationsreparatur auf die Bildung sowohl von Aberrationen als auch von SCE's Einfluß nehmen sollte.

4.3.2.1. Die Coffein-Nachbehandlung

In einer Untersuchung an *Vicia faba*-Wurzelspitzen die mit Quinacrine Mustard und nachfolgend mit Coffein behandelt wurden, konnten KIHLMAN et al. (1978) eine Erhöhung der Aberrationsrate um den Faktor 4,7 ermitteln. Dies wurde in einem vergleichbaren Experiment größenordnungsmäßig bestätigt (Abb.3), wobei die Absolutwerte bedingt durch unterschiedliche Kulturbedingungen hinsichtlich der Temperatur und des pH-Wertes niedriger lagen als die von KIHLMAN gefundenen. Bei der eigenen Untersuchung nehmen die Aberrationsraten bei Coffeinzugabe nach der Behandlung mit

Quinacrine Mustard um den Faktor 4, nach der UV-Bestrahlung um den Faktor 2 zu. Nach Anwendung des Chemomutagens plus Coffein manifestieren sich also gegenüber UV-Bestrahlung plus Coffein in allen drei Linien annähernd doppelt so viele Primärlesionen eines bestimmten Typs als Aberrationen, welcher im Normalfall mit Hilfe einer Rekombinationsreparatur korrigiert werden kann. Solche Induktorabhängige Wirkung des Coffein hat KIHLMAN (1978) für einige andere Mutagene beschrieben.

4.3.2.2. Die Coffein-Vorbehandlung

Über eine Coffeinzugabe vor der Mutagenbehandlung sind leider nur wenige und noch dazu widersprüchliche Daten anderer Autoren verfügbar:

- SCHÖNEICH et al. (1970) und SWIETLINSKA et al. (1973)

berichten übereinstimmend von gleichbleibenden Aberrationsraten in *Vicia faba*-Wurzelspitzen, wenn 4 bzw 2 h vor einer Behandlung mit Äthylalkohol bzw Diepoxymethan das Coffein in einer Konzentration von 0,4 bzw 0,2% appliziert wird.

- SHIRIASHI und Mitarbeiter (1980) untersuchten menschliche Lymphozyten, welche einen Zellzyklus lang einer 0,2%-igen Coffeinelösung ausgesetzt waren und danach mit Chemomutagenen behandelt wurden. Die Aberrationsrate wies eine geringe Steigerung auf.

- FRIEBE et al. (1982) konnten mangels Aberrationen nach einer UV-Bestrahlung keine Coffeineffekte aufzeigen.

- Bei den Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit konnte nun zum ersten Male beobachtet werden, daß Coffein-Vorbehandlung die Aberrationsrate deutlich senkt. Dieses Ergebnis ist nicht mit den zuvor aufgeführten Resultaten in Einklang zu bringen. Möglicherweise sind die divergierenden Ergebnisse auf die unterschiedliche Coffein-Konzentration und vor allen auf die unterschiedliche Dauer der Vorbehandlung zurückzuführen, da nach Vorbehandlung während eines

anzen Zellzyklus Effekte auftreten und nach einer Behandlung nur in der G 2 - Phase keinerlei Wirkung zu verzeichnen ist.

Bei der Vorbehandlung entsprechen die Divisionsfaktoren den Multiplikationsfaktoren bei der Nachbehandlung: Faktor 4 für Quinacrine Mustard und Faktor 2 für UV in allen drei Linien. Die exakt umgekehrte Wirkung bei Vorbehandlung mit Coffein gegenüber der Nachbehandlung kann nur spekulativ gedeutet werden: Vermutlich werden durch die Anwesenheit von Coffein im Zellzyklus vor der Mutagenapplikation Reparatursysteme verstärkt aktiviert, was zu einer schnellen und effektiven Beseitigung von Primärschäden führt, die durch das Mutagen hernach ausgelöst werden. Diese Reparatur-Aktivierung ist offenbar in gleichem Maße Induktor-abhängig wie die Reparatur-Hemmung, die bei der Coffein-Nachbehandlung auftritt.

Wie bei der Nachbehandlung (KIHLMAN et al., 1978, FRIEBE et al., 1982) so wurden auch bei der Vorbehandlung mit Coffein keine Effekte hinsichtlich der SCE-Raten erzielt. Die Wirkung des Coffein auf die SCE-Raten ist also nicht vergleichbar der auf die Aberrations-Frequenzen. Damit wird die Annahme KIHLMANs bestätigt, wonach Exchange-Aberrationen und SCE's beide S-Phase abhängig, aber dennoch auf unterschiedliche Weise entstehen.

4.3.3. Zusammenfassung

Die Unterschiede zwischen der Genese von Exchange-Aberrationen und der Entstehung von Schwesterchromatid-Austauschen ist offenbar größer als bislang angenommen. Gerade die als Gemeinsamkeit beider Phänomene betrachteten, wichtigen Vorgänge während der DNS-Synthesephase sind unterschiedlich. Daneben sind vermutlich auch die Primärschäden, die zu SCE führen andere als diejenigen, die der Aberration vorangehen.

4.4. Die Häufigkeit der meiotischen Rekombinationsergebnisse im Vergleich zu den Frequenzen von Exchange-Aberrationen und SCE.

Im vorhergehenden Kapitel konnte aufgezeigt werden, daß Schwesterchromatid-Austausch und Exchange-Aberration sich - trotz formaler Gemeinsamkeiten - unabhängig voneinander entwickeln. Im folgenden Abschnitt soll nun die Beziehung von SCE und Exchange-Aberration zur meiotischen Rekombination betrachtet werden.

Vicia faba Standard weist artspezifisch Frequenzen von jeweils 20 Chiasmata und SCE's auf. Gleiche SCE und Chiasmafrequenzen sind -mit Ausnahme von *Allium cepa* (SCHVARTZMAN und CORTES, 1977)-bei allen bis heute auf SCE untersuchten Pflanzenarten gefunden worden KIHLMAN and KRONBORG, 1975; FRIEBE, 1980, 1982, unveröffentlicht). Ein einfaches Gleichsetzen der Häufigkeiten von SCE und Chiasmata ist aber schon deshalb nicht möglich, weil unklar ist, ob die beobachteten 20 SCE's alle spontan entstanden sind oder durch das zur Analyse notwendige BrdU induziert worden sind. Eine Erhöhung der SCE-Raten konnte nach Behandlung mit BrdU während zweier Zellzyklen nicht festgestellt werden gegenüber einer Applikation in nur einem Zyklus (VOGEL, unveröffentlicht). Entweder sind nun die SCE's tatsächlich unbeeinflusst von BrdU spontan entstanden, oder die verwendete Konzentration von BrdU ist zu gering, als das sie in der Lage wäre, die SCE-baseline anzuheben.

Mit Hilfe von Mutagenen wie UV-Licht und Quinacrine Mustard lassen sich die SCE-Frequenzen deutlich anheben. Gleichzeitig entstehen einige wenige Chromosomen-Aberrationen, die hauptsächlich dem Exchange-Typus an gehören. Ordnet man die Häufigkeiten der drei Bruch- und Reunionsergebnisse der Reihe nach an, so ergibt sich:

SCE $\geq$ Crossing-over $\rightarrow$ Exchange-Aberrationen

Zieht man nun die Paarung oder benachbarte Lage der jeweils beteiligten DNS-Duplices in Betracht, so werden die Gründe für diese Häufigkeitsreihung deutlich:

- SCE werden während der DNS-Replikation gebildet. Die DNS der Schwesterchromatiden hat notwendigerweise zeitweilig über die gesamte Länge hin engsten Kontakt.
- Beim Vorgang des Crossing-over ist nicht die gesamte DNS derart assoziiert, daß Rekombination möglich wird, sondern lediglich kurze über die ganze Länge des Chromosoms verteilte Abschnitte, die in den Paarungsschleifen des Synaptonemalen Komplexes gelegen sind. Folgt man der Hypothese von STERN (1980), dann findet Crossing-over an einzelnen bis dahin nicht replizierten DNS-Abschnitten statt, die nun im Zuge einer Pachytän-Replikation rekombiniert werden. Nur ein bestimmter Teil der DNS ist also an den Rekombinationsvorgängen während der meiotischen Prophase beteiligt.
- Exchange-Aberrationen entstehen nach der contact-first Theorie und allen daraus entwickelten Modellen nur dann, wenn sich zwei zufällig entstandene Schädstellen einander nähern und fusionieren. Entscheidend hierfür ist erstens die Menge der DNS-Schäden und zweitens die Fähigkeit der DNS-Duplices miteinander in Kontakt zu kommen. Da die DNS-Schäden selten auftreten und über eine systematische Annäherung solcher Schädstellen nichts bekannt ist, sind die Exchange-Aberrationen die am wenigsten häufigen der drei untersuchten Bruch- und Reunionsvorgänge zwischen DNS-Duplices.

Spontan-Aberrationen sind in keiner der drei Linien, A 8 A 16 und Standard (mit Ausnahme einer Aberration bei Coffein-Nachbehandlung in der Standardform) zu verzeichnen. Die Mutanten unterscheiden sich also nicht von der Standardform. Sie bilden nicht mehr Exchange-Aberrationen, sind nicht empfindlicher hinsichtlich der Aberrationsbildung.

Um nun zu testen, ob die Mutaneten doch Sensibilitätsunterschiede aufweisen -sie könnten ja unempfindlicher im Vergleich zur Standard-Vicia sein- muß eine Aberrationsrate durch Mutagene induziert werden.

Die SCE-Raten der drei Linien werden deutlich angehoben, unterscheiden sich aber, wie schon zuvor die Häufigkeiten der "Spontan-SCE's", nicht voneinander. Dagegen zeigen die Aberrationsraten eine deutliche Tendenz zur Korrelation mit der jeweiligen Chiasmafrequenz: Die Linie mit der geringsten Chiasmafrequenz weist auch die wenigsten Aberrationen auf. Dabei sind ebenso wie in der Standardlinie fast ausschließlich Exchange-Aberrationen ausgelöst worden, Brüche dagegen kaum.

Experimente mit Rekombinations-Mutanten bei Bakterien (LASKOWSKI, 1981), bei Pflanzen (RILEY and MILLER, 1966) und beim Menschen (PEARSON et al., 1970) haben ergeben, daß in den meisten Fällen reduzierte Rekombinationsfähigkeit mit erhöhter Sensibilität gegenüber Mutageneinwirkung einhergeht. Das ist auch zu erwarten, wenn Rekombinationsprozesse an der Reparatur der DNS-Schäden beteiligt sind. Fällt ein solcher Reparaturmechanismus auf Grund verminderter Rekombinationsfähigkeit aus oder ist gehemmt, so erhöht sich die Aberrationsrate.

Die Mutanten von Vicia faba verhalten sich jedoch umgekehrt, sie reagieren weniger sensibel auf Mutagene. Hier tritt nun die Frage auf, ob oligochiasmatische Meiosis von A 8 und A 16 darauf beruht, daß wie in den oben beschriebenen Fällen die eigentlichen Rekombinationsvorgänge gehemmt sind, also Desynapsis vorliegt, oder daß die Chromosomenpaarung teilweise ausgefallen ist, es sich also um Asynapsis handelt.

Desynapsis müßte aber generell Auswirkungen auf andere Austauschereignisse zwischen DNS-Duplices haben, also neben

der auf die Aberrationsraten auch Auswirkungen auf die SCE-Häufigkeiten. Wenn SCE Ausdruck einer Rekombinationsreparatur ist, so müßten sich im Falle der Desynapsis die SCE-Raten vermindern. Weder erhöhte Aberrationsraten noch verminderte SCE-Raten wurden bei den Vicia-Mutanten beobachtet.

Es gibt Hinweise darauf, daß tatsächlich Asynapsis, also der teilweise Paarungsausfall der Homologen im Pachytän, der Grund für die abnorme Meiosis der Mutanten von Vicia faba ist. Damit ließe sich erklären, warum die SCE-Raten keine Beziehung zu den Chiasmafrequenzen erkennen lassen. Bei Asynapsis sind nicht die eigentlichen Austauschprozesse gestört. Die Zelle ist potentiell noch in der Lage, eine "normale" Anzahl von Brüchen und Reunionen zwischen DNS-Duplices zu produzieren. Bei der SCE-Bildung ist ein Paarungsausfall, wie er in der meiotischen Prophase vermutlich vorliegt, nicht denkbar, da die Schwesterchromatiden bei der Entstehung der SCE dicht beieinanderliegen. So bilden auch die Mutanten normale SCE-Raten.

Die Fähigkeit der DNS verschiedener Chromosomen mit der DNS anderer Chromosomen in so engen Kontakt zu geraten, daß die Doppelmoleküle rekombinieren können, ist bei den Mutanten geringer als bei der Normalform. Ob aber der Hemmung der Pachytänpaarung und der der Chromosomenreunion eine gemeinsame Ursache zu Grunde liegt, muß durch weitere Arbeiten geklärt werden.

Faßt man die Überlegungen zusammen, so ist ein Rekombinationsprozeß allgemein aufzugliedern in

1. die Induktion eines Primärschadens; dies ist für das Crossing-over nicht notwendig, da hier innere Faktoren, Enzyme für DNS-Einschnitte verantwortlich sind;
2. eine Art Rekombinationsreparatur, bei der die beteiligten Doppelhelices zusammengefügt werden. Selbstverständlich ist

nicht nur Reunion, sondern auch Restitution, d.h. Wiederherstellen des ursprünglichen Zustandes möglich.

3. Die Rekombinationsreparatur kann erst dann stattfinden, wenn die Austauschpartner zueinander in Kontakt gekommen sind. Diese Kontaktaufnahme ist als solche vom Rekombinationsvorgang unabhängig, sie bestimmt jedoch die Häufigkeit der Ereignisse.

5. ZUSAMMENSCHAU

Die Standardform und zwei durch abgestuft reduzierte Chiasmafrequenz ausgezeichnete Mutanten von *Vicia faba* werden hinsichtlich ihrer SCE- und Exchange-Aberrationsraten untersucht. Sowohl das dem Chiasma zu Grunde liegende Crossing-over als auch SCE und Exchange-Aberrationen beruhen auf Bruch und Reunion von DNS - Doppelhelices.

SCE und Exchange-Aberrationen werden durch die S-Phase-abhängig wirkenden Mutagene UV-Licht und Quinacrine Mustard induziert. Beide Mutagene lösen in den angewandten Dosen etwa gleich viele Aberrationen, jedoch unterschiedlich viele SCE's aus. Das deutet auf eine unterschiedliche Genese beider hin, wobei vermutlich schon die Primärereignisse unterschiedlich sind, die zu SCE oder Exchange-Aberration führen.

Coffein, nach einer Mutagenbehandlung appliziert, erhöht S-Phase-abhängig wirkend die Aberrationsraten, läßt aber die SCE-Frequenzen unberührt. Die S-Phase-abhängige Bildung von SCE und Exchange-Aberration ist unterschiedlich.

Coffein-Vorbehandlung senkt die Aberrationsraten. Vermutlich liegt ein der Reparatur-Hemmung bei der Nachbehandlung entgegengesetzter Effekt vor, nämlich eine Reparatur-Aktivierung.

Die oligochiasmatischen Mutanten weisen "normale" SCE-Raten, aber entsprechend ihrer Chiasmazahl reduzierte Aberrationsraten auf. SCE ist das häufigste, Crossing-over das zweithäufigste und die Aberration das seltenste Bruch- und Reunionsergebnis. Dies erklärt sich durch die Länge der jeweils an den Austauschen beteiligten DNS-Abschnitte.

Die Reduktion der Chiasmafrequenz beruht vermutlich auf Asynapsis im Pachytän, d.h. auf teilweisem Ausfall der Paarungsstruktur. Die Korrelation zwischen Chiasmafrequenz und Aberrationsrate legt die Vermutung nahe, daß die Reduktion beider auf gleichen Faktoren beruht.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- BEEK, B. and G.OBE (1975): The human leukocyte test system. VI.: The use of sister chromatid exchanges as possible indicators for mutagenic activities. *Humangenetik* 29, 127-134.
- BOSTOCK, C.J. and A.T.SUMNER (1978): The eukaryotic chromosome. Elsevier North Holland, Amsterdam.
- DELVAUX, A.M. and R.DEVORET (1969): The occurrence of suppressors in caffeine-resistant mutants from E. coli K 12. *Mut. Res.* 7, 273-285.
- DEMIN, Y.S. and T.V.ELISOVA (1971): Analysis of the "sticking period" of chromosomes in mammalian cells in vitro and some problems affecting the formation of structural mutations. *Sov. Genet.* 7, 605-612.
- EVANS, H.J. (1977): What are sister chromatid exchanges? *Chromosomes today*, Vol.6, 315-326.
- FRIEBE, B. (1980): Comparison of sister chromatid exchange and chiasma formation in the genus Secale. *Microsc. Acta*, 83, 103-110.
- FRIEBE, B.; G.LINNERT and R.VOGEL (1982): Effects of UV-light and caffeine on sister chromatid exchange in Secale cereale in relation to incorporation of BrdU during one or two cell cycles. *Microsc. Acta* 86, 49-58.
- ISHIZAKI, K.; O.NIKAIIDO and H.TAKEBE (1980): Photoreactivation of UV-light-induced SCE's in potorous cells. *Photochem. Photobiol.* 31, 277-279.
- KATO, H. (1974 b): Photoreactivation of SCE's induced by UV-irradiation. *Nature* 249, 552-553.
- KIHLMAN, B.A. (1977): Caffeine and chromosomes. Elsevier North Holland, Amsterdam.

- KIHLMAN, B.A. and D.KRONBORG (1975): Sister chromatid exchanges in Vicia faba. I. Demonstration by a modified fluorescent plus giemsa (FPG) technique. Chromosoma 51, 1-10.
- KIHLMAN, B.A. and S.STURELID (1978): Effects of caffeine on the frequencies of chromosomal aberrations and SCE's induced by chemical mutagens in root tips of Vicia faba. Hereditas 88, 35-41.
- KORENBERG, J.R. and E.F.FREEDLENDER (1974): Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. Chromosoma 48, 355-360.
- LATT, S.A. (1981): Sister chromatid exchanges. Ann. Rev. Genet., Vol. 15, 11-55.
- LINNERT, G.; R.VOGEL und B.FRIEBE (1981): Schwesterchromatid-austausch und Chiasmabildung bei der Normalform und zwei asynaptischen Mutanten von Vicia faba L. Z. Pflanzen-züchtg. 86, 192-200.
- NATARAJAN, A.T. (1982): Relationship between sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations. in MÜLLER, D.; NATARAJAN, A.T.; OBE, G. and RÖHRBORN, G.: Sister-chromatid exchange test. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, Seite 6-10
- NATARAJAN, A.T.; A.A.van ZEELAND; E.A.M.VERDEGAAL-IMMERZEEL and A.R. FILON (1980): Studies on the influence of photo-reactivation on the frequencies of UV-induced chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and pyrimidine dimers in chicken embryonic fibroblasts. Mut. Res. 69, 307-317.
- PEARSON, P.L.; J.D.ELLIS and H.J.EVANS (1970): A gross reduction in chiasma formation during meiotic prophase and a defective DNA repair mechanism associated with a case of human male infertility. Cytogenetics 9, 460-467.

- PERRY, P.E. 1980): Chemical mutagens and sister-chromatid exchange. in deSERRES, F.J. and HOLLAENDER, A : Chemical mutagens, Vol.6, 1-39, Plenum Press, New York-London.
- REVELL, S.H. (1955): A new hypothesis for "chromatid" changes. in BACQ, A.M. and P.ALEXANDER (Eds.) Proc. Radiol.Symp.Lüttich 1954, 243-253, Butterworths, London.
- REVELL, S.H. (1959): The accurate estimation of chromatid breakage, and its relevance to a new interpretation of chromatid aberrations induced by ionizing radiations. Proc.R.Soc.Lond. Ser.B 150, 563-589.
- RILEY, R. and T.E. MILLER (1966): The differential sensitivity of desynaptic and normal genotypes of barley to X-rays. Mut. Res. 3, 355-359.
- ROMMELAERE, J.; M.SUSSKIND and M.ERRERA (1973): Chromosome and chromatid exchanges in Chinese hamster cells. Chromosoma 41, 243-257.
- SAX, K. (1940): An analysis of X-ray induced chromosomal aberrations in Tradescantia. Genetics 25, 41-68.
- SAX, K. (1941): Types and frequencies of chromosomal aberrations induced by X-rays. Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol.9, 93-101.
- SCHÖNEICH, J.; A.MICHAELIS und R.RIEGER (1970): Coffein und die chemische Induktion von Chromatidenaberrationen bei Vicia faba und Ascitestumoren der Maus. Biol. Zbl.89, 49-63.
- SCHVARTZMAN, J.B. and F.CORTES (1977): Sister chromatid exchange in Allium cepa. Chromosoma 62, 119-131.

- SEREBROVSKY, A.S. (1929): A general scheme for the origin of mutations. *Am. Nat.* 63, 374-378.
- SHIRIASHI, Y. and A.A.SANDBERG (1980): Effects of caffeine-induced defective DNA replication on SCE and chromosome aberrations produced by alkylating agents. *Mut.Res.* 72, 251-256.
- SJÖDIN, J. (1970): Induced asynaptic mutants in Vicia faba L. *Hereditas* 66, 215-232.
- STADLER, L.J. (1931): The experimental modification of heredity in crop plants. I. Induced chromosomal irregularities. *Sci.Agric.* 11, 557-572.
- STERN, H. (1980): Chemistry of the meiotic process. Plenar-Vortrag auf der 7th Chromosome Conference, Oxford
- SWIETLINSKA, Z.; D.ZABOROWSKA and J.ZUK (1973): Induction of chromosome Aberrations by diepoxybutane and caffeine in root meristems and germinating seeds of Vicia faba. *Mut. Res.* 17, 199-205.
- TIMPSON, J. (1977): Caffeine *Mut.Res.* 47, 1-52.
- WOLFF, S. (1977): Sister chromatid exchange. *Ann. Rev. Genet.* Vol. 11, 183-201.
- WOLFF, S. (1978): Relation between DNA repair, chromosomal aberrations, and SCE's. In HANAWALT et al.:DNA repair mechanisms. Vol.IX, 751-760, ICN-UCLA Symp.Mol.Biol.

Frau Prof. Dr. G. LINNERT danke ich für die Überlassung des Themas und für ihre vielen Anregungen und Ratschläge, mit denen sie das Zustandekommen dieser Arbeit unterstützt hat.

Ebenso danke ich Herrn Dr. D. ADAM und Herrn Dr. B. FRIEBE, die mir mit Rat und Tat bei der Anfertigung dieser Arbeit zur Seite gestanden haben.

LEBENS LAUF

Name	Richard Vogel
Geboren	am 18. Juni 1952 als Sohn des Drogisten Werner Vogel und seiner Ehefrau Erika, geb. Steuber in Weidenau, Kreis Siegen
Schulbildung	1959-1964 Volksschule in Siegen und in Osnabrück 1964-1973 Städtisches Gymnasium in Siegen
Wehrdienst	Juli 1973 - September 1974
Studium	WS 1974/75 ältere Geschichte und Philosophie an der Technischen Universität Berlin Seit SS 1975 Biologie an der Freien Universität Berlin SS 1977 Vordiplom Diplom mündlich: Oktober 1979 schriftl.: März 1981 Ab SS 1981 Arbeit an der vor- liegenden Dissertation

